

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* Linn)

2.1.1. Morfologi dan Klasifikasi

Sirih hijau merupakan tumbuhan merambat dan tumbuh memanjang sampai 5-15 m dengan bunga berbentuk bulir, berdiri sendiri diujung cabang berhadapan dengan daun. Bulir jantan memiliki panjang gagang 1,5- 3cm dengan benang sari yang sangat pendek, bulir betina memiliki panjang 2,5 – 6cm dengan kepala putik 3-5 buah. Buah buni sirih hijau berbentuk bulat dengan ujung gundul. Bulir masak memiliki tebal 1-1,5cm, berambut kelabu dengan biji membentuk lingkaran.(Prayoga, 2013)



Gambar 2.1 Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) (Purnama,2017)

Berdasarkan klasifikasi dan ilmu taksonomi dari *Piper betle* Linn.

(Purnama, 2017).

Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Piperales
Family	: Piperaceae
Genus	: Piper
Species	: <i>Piper betle</i> Linn

Di Indonesia ada beberapa jenis sirih. Daun sirih kuning atau sirih kuning tersebar luas di daerah Sumatra dan Jawa Barat. Sedangkan daun sirih hijau atau sirih hijau yang memiliki rasa pedas apabila daun berwarna hijau tua banyak tersebar di Jawa tengah dan Jawa Timur. Adapula sirih dengan sebutan sirih merpati yang memiliki daun berwarna kuning dan tulang daun berwarna merah. Serta sirih hitam yang dikhususkan untuk obat.

Tanaman sirih hijau dapat tumbuh di daerah yang memiliki kelembapan yang cukup tinggi. Dengan sistem pengairan yang baik dan tanah dengan kaya akan materi organik dapat tumbuh subur. Tanaman sirih hijau merupakan tanaman asli dari kawasan Indo-Cina, yaitu : Indonesia, Malaysia, Laos, Thailand, India dan tersebar luas (Sulastri, 2017).

2.1.2. Manfaat dan Kandungan Kimiawi Sirih Hijau (*Piper Betle* Linn).

Bau yang khas pada daun sirih hijau (aromatik) disebabkan oleh adanya kandungan minyak atsiri yang terdiri atas fenol dan terpen. Minyak atsiri ini akan berinteraksi dengan sel bakteri dengan cara adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah, terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan lemah dan segera mengalami penguraian. Hal ini akan diikuti masuknya fenol ke dalam sel dan menyebabkan denaturasi dan presipitasi protein. Pada kadar tinggi, fenol dapat menyebabkan koagulasi protein sehingga sel membran mengalami lisis (Pratiwi, 2008). Selain itu, daun sirih (*Piper betle* L.) diketahui juga memiliki senyawa lain turunan fenol yaitu kavikol. Kavikol memiliki sifat antiseptik lima kali lebih efektif dibandingkan fenol biasa (Atni, 2010).

Apabila semakin besar kandungan fenol yang dimiliki daun sirih maka akan semakin bagus kualitas yang dimiliki daun sirih tersebut. Daun sirih memiliki banyak senyawa metabolit-metabolit sekunder seperti minyak volatil (eugenol, safrol, metil ester) komponen fenol (*hydroxyl chavicol*, *chavicol*) asam lemak hidroksil (palmitat, stearat, miristat dan asam lemak (palmitat dan stearat) yang berfungsi sebagai antibakterial dan dapat digunakan untuk infeksi mikroba (Bangash *et al.*, 2012).

Pada daun sirih memiliki fungsi sebagai antimikroba kuat disebabkan oleh adanya kandungan flavonoid, ester, alkaloid dan asam benzoat (Foo *et al.*, 2015). Senyawa flavonoid memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan membentuk suatu senyawa yang kompleks terhadap protein ekstraseluler bakteri sehingga dapat mengganggu kerja dari membrane sel bakteri. Senyawa tersebut juga dapat mempersingkat waktu inflamasi yang memungkinkan untuk proses proliferasi (Indraswari, 2011). Flavonoid dapat menghambat oksidasi lipid dengan cara berinteraksi dengan membrane sel bakteri akibatnya dapat melindunginya dari radikal bebas.

Alkaloid juga merupakan salah satu senyawa sekunder yang dapat merusak komponen-komponen penyusun petidoglikan bakteri. Hal tersebut mengakibatkan degradasi pertumbuhan membrane sel bakteri sehingga dapat menyebabkan kematian pada sel. Tannin merupakan senyawa sekunder yang terdapat dalam ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.). Senyawa tersebut dapat mengganggu permeabilitas sel yaitu dengan cara mengerutkan dinding selnya yang dapat menyebabkan sel-sel bakteri mengalami gangguan pada pertumbuhannya dan bahkan mati. Kandungan yang terdapat didalamnya terdapat astringen, polifenol yang memiliki rasa pahit dan dapat mengendapkan dan mengikat protein (Sudarma, 2014).

Daun Sirih hijau (*Piper betle* Linn) memiliki efek sebagai analgesik, amebisid, antiseptik, fungisid dan lainnya. Digunakan juga untuk mengobati konstipasi, bau mulut, keputihan, mengobati batuk, asma dan berbagai penyakit lainnya (Pinatik et al, 2017).

2.2. Tinjauan Umum Disentri

2.2.1. Definisi Disentri

Disentri merupakan infeksi akut yang menyebabkan radang pada kolon, yang disebabkan oleh kuman di tandai dengan gejala diare, adanya lendir dalam tinja serta tenesmus dan nyeri perut. Disentri basiler adalah infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Shigella* sp yang terjadi di usus besar. Penyakit tersebut ditandai dengan demam, koitis dan diare berdarah (Widyasanti dkk, 2016).

2.2.2. Penyebab Disentri

Disentri disebabkan oleh *Shigella dysntriae* yang kemampuannya membentuk eksotoksin dan endotoksin. Toksin pada *Shigella* mempunyai efek multiple yaitu, enterotoksin, neurotoksin (Puspitasari dan Mukono, 2013).

2.2.3. Patologi Disentri

Dengan cara masuk kedalam mulut kemudian dengan cepat sampai ke usus, di dalam usus besar *Shigella dysentriae* memperbanyak diri dengan cara cepat. Toksin yang di keluarkan oleh bakteri ini menimbulkan mukosa usus meradang bahkan akan memicu terjadinya ulserasi mukosa (Widyasanti dkk, 2016).

2.2.4. Epidemiologi

Disentri mudah menyebar pada kondisi lingkungan yang buruk. Penularannya melalui oral pada makanan dan minuman yang terkontaminasi oleh bakteri dan kurangnya higienitas, sebagai vektornya adalah lalat. (Puspitasari dan Mukono, 2013) dan (Shigellosis Investigation Guidelines, 2012).

Di Indonesia sendiri penyakit diare masih merupakan masalah kesehatan yang tinggi untuk angka morbiditas dan mortalitasnya. Penyakit tersebut masih menjadi penyebab kematian pada anak dibawah 5 tahun yaitu sebesar 25,2% (Kemenkes, 2011). Angka morbiditas (kesakitan) diare di Indonesia sepanjang tahun 2016 mencapai 6.897.463 dan diare yang telah ditangani mencapai 36,9% atau sebanyak 2.544.084 (Kemenkes, 2017). Penyebab diare yang terpenting dan tersering di negara berkembang adalah bakteri *Shigella*, khususnya *S.dysentriae* dan *S.boydi* yang menyebabkan diare disentri (CDC, 2015).

2.2.5. Pencegahan

Pencegahan yang dapat dilakukan adalah dengan sanitasi lingkungan dan penjagaan *hygiene*, perlunya mencuci tangan sebelum makan, persediaan air minum tidak boleh terkontaminasi, menjaga pembuatan makanan dan penyimpanannya, pemakaian jamban yang baik, sejauh ini belum ada vaksin yang efektif (Bangkele dkk, 2015).

2.3. Definisi Bakteri

Bakteri merupakan organisme ber sel tunggal yang hidup bebas tanpa klorofil dan memiliki DNA maupun RNA. Bakteri dapat melakukan semua proses-proses dasar kehidupan misalnya tumbuh, metabolisme dan perkembangbiakan (Gupte, 1990). Bakteri dibagi menjadi dua golongan, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Perbedaan golongan bakteri ini dapat ditentukan dengan pewarnaan bakteri. Bakteri diwarnai dengan zat warna violet dan yodium, dibilas dengan alkohol, kemudian diwarnai lagi dengan zat warna merah. Struktur dinding sel akan menentukan respon pewarnaan.

Bakteri Gram positif yang sebagian besar dinding selnya terdiri dari peptidoglikan akan menyerap warna violet. Bakteri gram negatif memiliki lebih sedikit peptidoglikan, yang terletak di suatu gel periplasmik antara membrane plasma dan suatu membran bagian luar. Zat warna violet yang digunakan dalam pewarnaan gram sangat mudah dibilas oleh alkohol pada bakteri gram negatif, tetapi selnya tetap menahan zat warna merah (Delost, 2015).

2.4. Bakteri *Shigella dysenteriae*

Shigella dysenteriae berbentuk kokobasil dengan pengecatan gram bersifat negatif dengan ukuran $0,5 - 0,7 \mu\text{m} \times 2 - 3 \mu\text{m}$, tidak mempunyai flagel sehingga tidak dapat bergerak dan tidak berspora. Bakteri ini tumbuh optimal pada suhu 37°C pada media mac conkey agar, sistem satu arah (SSA), *eosin methylene blue agar* (EMBA), *mueller hinton agar* (MHA), dan endo agar. *Shigella* juga dapat dibedakan menjadi 2 bagian yaitu bagian yang dapat memfermentasi manitol dan yang tidak dapat memfermentasi manitol. Semua spesies *Shigella* menyebabkan diare berdarah yang akut dengan menyerang dan menyebabkan kehancuran dari koloni epitelium. *Shigella sp* mempunyai susunan antigen yang kompleks. Klasifikasi *Shigella sp* didasarkan pada sifat-sifat biokimia dan antigeniknya (Carroll, 2016).

2.4.1. Klasifikasi *Shigella dysenteriae*

Adapun klasifikasi bakteri *Shigella dysenteriae* sebagai berikut (Tantri, 2016) :

Kingdom : Bacteria

Filum : Protobacteria
 Kelas : Gamma protobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Famili : Enterobacteraceae
 Genus : Shigella
 Spesies : *Shigella dysenteriae*

2.4.2. Morfologi *Shigella dysenteriae*

Merupakan kuman dengan berbentuk batang 0,5 -0,7 μm x 2-3 μm pada pewarnaan gram bersifat gram negatif dan tidak berflagel. *S. dysenteriae* berbentuk kokobasil, koloninya konveks, bulat, transparan dengan pinggir-pinggir utuh, dan dapat mencapai diameter sekitar 2 mm dalam 24 jam (Brooks *et al.*, 2007).



Gambar 2.2 Bakteri *Shigella dysenteriae*
 Sumber: (Zakwan *et al.*, 2018)

Bakteri ini memiliki sifat anaerob dan paling baik tumbuh secara aerob, pH yang dibutuhkan untuk tumbuh adalah 6,4-7,8 dan suhu untuk pertumbuhan secara optimum adalah 37°C. *S.dysenteriae* dapat meragikan glukosa tetapi tidak meragikan laktosa. *S. dysenteriae* memiliki struktur atau bagian-bagian sebagai berikut :

1. Dinding Sel

Dinding sel bakteri ini memiliki lapisan membran luar yaitu peptidoglikan

yang dapat menyebabkan dinding sel mengandung lipid yang sangat banyak yaitu 11- 22% lapisan membrane luar memiliki struktur sebagai unit terdiri dari fosfolipid, membrane plasma, polisakarida dan protein. Struktur lipopolisakarida dibentuk oleh lipid dan polisakarida. Pada lapisan luar memiliki sifat impermeable terhadap molekul besar, tetapi dapat melarutkan molekul kecil hal ini disebabkan karena porin yang memiliki fungsi sebagai reseptor bakteriofag dan bakteriosin (Waluyo, 2004).

2. Membran Sel

Merupakan struktur yang tipis yang terdiri dari fosfolipid dan protein. Dimana fosfolipid ini struktur dasar dari membrane sel karena terdiri dari bagian yang bersifat hidrofobik dan hidrofilik yang saling berdekatan sehingga membentuk dua lapis (Jawet, 2001).

3. Ribosom

Terdiri dari RNA dan protein. Ribosom merupakan struktur yang mengandung asam ribonukleat dan berfungsi untuk mengatur sintesis protein.

Bakteri Gram negatif inokulasi pada daerah DNA, pembelahan sel atau pembentukan spora. Sehingga dapat dikatakan bahwa mesosom adalah membrane sitoplasma dimana dengan melipat kearah dalam sitoplasma, dan fungsi dari mesosom adalah dalam sintesis dinding sel dan pembelahan nukleus, respirasi dan pengertakan energy, mengatur pembelahan sel, tempat melekatnya nukleus pada saat replikasi, mengambil DNA pada transformasi (Jewetz, 2001).

5. Sitoplasma

Merupakan cairan yang terdapat didalam sel, sitoplasma tersusun dari koloid yang mengandung berbagai molekul organik antara lain karbohidrat, lemak, protein dan mineral. Sitoplasma merupakan tempat berlangsungnya reaksi metabolisme (Carr, 2016)

6. Membran Plasma

Merupakan bagan tipis yang berada dibawah di dinding sel dan membungkus sitoplasma. membran sel ini tersusun fosfolipid dan protein membentuk struktur fosfolipid bilayer dengan bagian kepala dan ekor. Dimana bagian kepala bersifat larut air dan bagian ekor bersifat tidak larut air. Isi membrane plasma adalah enzim untuk respirasi seluler, murein, dan sintesis peptidoglikan serta pengangkutan zat dalam dan luar sel.

2.4.3. Toksin *Shigella dysenteriae*

Shigella sp dapat menghasilkan toksin, toksin ini berikatan dengan reseptor dan dapat menyebabkan aktivasi proses sekresi sehingga terjadi diare cair yang dapat ditemukan pada awal penyakit. Hal ini merupakan tanda dari enterotoksik shigatoksigen yang kemudian melibatkan usus besar atau kolon dan invasi jaringan. Efek dari toksin ini lebih ke absorpsi elektrolit, glukosa, dan asam amino (Dzen dkk, 2003). *S.dysenteriae* memproduksi toksin yang tidak tahan panas sehingga dapat mempengaruhi saluran pencernaan dan SSP. Toksin *Shigella dysenteriae* dapat dibedakan menjadi dua, yaitu:

1. Endotoksin

Pada waktu terjadi autolysis, semua *Shigella* mengeluarkan lipopolisakaridanya yang toksik. Endotoksin ini mungkin menambah iritasi pada dinding usus (Dzen dkk., 2003).

2. Eksotoksin (*S. dysenteriae*)

S. dysenteriae tipe 1 (basil Shiga) memproduksi eksotoksin yang tidak tahan pemanasan yang dapat mempengaruhi usus dan SSP. Eksotoksin ini merupakan protein yang bersifat antigenik dan mematikan untuk hewan coba. Pada manusia zat ini dapat menghambat absorpsi gula dan asam amino di usus halus. Sifat invasif pada *S. dysenteriae* bekerja berurutan toksin menyebabkan diare awal yang encer dan tidak berdarah serta invasi usus besar mengakibatkan disentri yang berlanjut dengan tinja yang disertai darah (Brooks et al., 2007).

2.5. Tinjauan Antibiotik

2.5.1. Definisi Antibiotik

Antibiotika adalah zat-zat kimia oleh yang dihasilkan oleh fungi dan bakteri, yang memiliki khasiat mematikan atau menghambat pertumbuhan kuman, sedangkan toksisitasnya bagi manusia relatif kecil. Turunan zat-zat ini, yang dibuat secara semi-sintesis, juga termasuk kelompok ini, begitu pula senyawa sintesis dengan khasiat antibakteri (Tjay & Rahardja, 2007). Antibiotik adalah zat biokimia yang diproduksi oleh mikroorganisme, yang dalam jumlah kecil dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh pertumbuhan mikroorganisme lain (Harmita dan Radji, 2008).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dapat dibagi menjadi empat kelompok yaitu:

Tabel II.1 Mekanisme Kerja Antibiotik

No.	Meknisme Kerja	Cara
1.	Menghambat sintesis dinding sel	Merusak lapisan peptidoglikan yang menyusun dinding sel (Pratiwi, 2008)
2.	Merubah permeabilitas sel	Merusak membran plasma yang merupakan pengendali transport berbagai metabolit sehingga apabila membran ini rusak maka pertumbuhan sel akan terganggu dan sel akan mati (Pratiwi, 2008).
3.	Merubah molekul asam nukleat dan protein	Mendenaturasi protein dan asam nukleat sehingga sel tidak dapat diperbaiki lagi (Pratiwi, 2008)
4.	Menghambat sintesis asam nukleat dan protein	Mengganggu pembentukan dan mengganggu fungsi dari DNA, RNA, dan protein sehingga menghambat transkripsi dan replikasi (Pratiwi, 2008)

2.5.2. Penggolongan Antibioitik

Berdasarkan spectrum atau kisaran terjadinya, antibiotik dapat dibedakan menjadi 2 kelompok, yaitu:

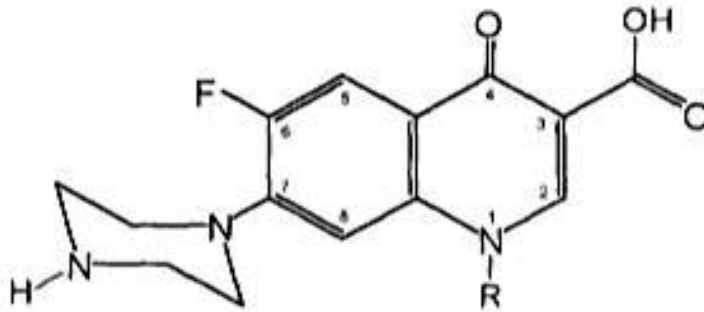
1) Antibiotik berspektrum sempit (*narrow spectrum*).

Merupakan antibiotik yang mampu menghambat segolongan jenis bakteri saja, contohnya hanya mampu menghambat atau membunuh bakteri gram negatif saja. Yang termasuk dalam golongan ini adalah penisilin, streptomisin, neomisin, basitrasin.

2. Antibiotik berspektrum luas (*broad spectrum*),

Merupakan antibiotik yang dapat menghambat atau membunuh bakteri dari golongan gram positif dan gram negatif. Berbagai antibiotik yang termasuk golongan ini adalah tetrasiklin dan derivatnya, siprofloksasin, ampicilin, sefalosporin, carbapenem, dan lain-lain. (Pratiwi, 2008)

2.5.3. Siprofloksasin



Gambar 2.3 Struktur Kimia Siprofloksasin (Redha, 2010)

Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon yang berspektrum luas (*broad spectrum*) yang paling umum digunakan, di negara berkembang seperti Indonesia siprofloksasin diindikasikan untuk pengobatan infeksi saluran cerna, saluran kemih, saluran nafas, infeksi kulit jaringan lunak, infeksi tulang dan sendi yang disebabkan oleh bakteri (BPOM, 2017). Mekanisme kerja siprofloksasin adalah dengan cara menghambat DNA gyrase (topoisomerase II) dan topoisomerase IV yang terdapat dalam bakteri. Penghambatan terhadap enzim yang terlibat dalam replikasi, rekombinasi dan reparasi DNA tersebut mengakibatkan penghambatan terhadap pertumbuhan sel bakteri (Sarro, 2001).

Pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram negatif seperti *E. coli*, *Shigella sp*, *Chlamydia sp*, *Proteus mirabilis*, *Klasiella sp*, *Salmonella sp*, *Enterobacter*, *P. aeruginosa* dan tidak jarang bakteri tertentu dengan gram positif maka digunakannya antibiotik siprofloksasin. Mekanisme kerja dari siprofloksasin yaitu dengan menghambat proses terbentuknya superkoil DNA yang berikatan dengan enzim DNA gyrase sub unit A yaitu suatu enzim yang penting pada replikasi dan perbaikan DNA. Senyawa flavonoid dapat berikatan dengan peptidoglikan pada dinding sel bakteri sehingga terjadi pengendapan protein yang selanjutnya dapat menghambat proses biosintesis peptidoglikan dan menghambat DNA gyrase. Alkaloid dapat merusak sintesis dinding sel sehingga dapat

menyebabkan sel menjadi lisis (Cushnie and Lamb, 2005).

2.6. Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu metode pemisahan senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, biasanya antara pelarut air dan pelarut organik seperti metanol, etanol, etilasetat, n-heksana dan petroleum eter (Dey, 2012). Fraksinasi tersebut bertujuan untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain. Pemisahan jumlah dan jenisnya senyawa menjadi fraksi yang berbeda yang tergantung pada jenis tumbuhan. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Harborne, 1987).

Fraksinasi bertingkat biasanya menggunakan pelarut organik seperti eter, aseton, benzena, etanol, diklorometana, atau campuran pelarut tersebut. Asam lemak, asam resin, lilin, tanin, dan zat warna adalah bahan yang penting dan dapat diekstraksi dengan pelarut organik. Fraksinasi bertingkat umumnya diawali dengan pelarut yang kurang polar dan dilanjutkan dengan pelarut yang lebih polar. Tingkat polaritas pelarut dapat ditentukan dari nilai konstanta dielektrik pelarut (Adjuwana dan Nur, 1989).

2.7. Tinjauan Pelarut

Pemilihan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan semaksimal mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel, 1989). Pelarut organik berdasarkan konstanta dielektrik dapat dibedakan menjadi dua, yaitu pelarut polar dan pelarut non-polar. Semakin tinggi konstanta dielektrikunya maka pelarut semakin bersifat polar (Sudarmadji dkk., 1989).

Pelarut minyak atau lemak yang biasa digunakan dalam proses ekstraksi antara lain (Susanti et al., 2012) :

1. Etanol

Merupakan pelarut yang sering digunakan sebagai pelarut dalam laboratorium karena mempunyai kelarutan yang relatif tinggi dan bersifat inert

sehingga tidak bereaksi dengan komponen lainnya. Etanol memiliki titik didih yang rendah sehingga memudahkan pemisahan minyak dari pelarutnya dalam proses distilasi.

2. N-Heksana

Merupakan pelarut yang paling ringan dalam mengangkat minyak yang terkandung dalam biji-bijian dan mudah menguap sehingga memudahkan untuk refluks. Pelarut ini memiliki titik didih antara 65–70°C.

3. Etil asetat

Merupakan jenis pelarut yang bersifat semi polar. Pelarut ini memiliki titik didih yang relatif rendah yaitu 77°C sehingga memudahkan pemisahan minyak dari pelarutnya dalam proses destilasi.

2.7.1. Pelarut N-Heksan

N-heksana adalah hidrokarbon alkana rantai lurus yang memiliki 6 atom karbon dengan rumus molekul C_6H_{14} . Isomer heksana tidak reaktif dan digunakan sebagai pelarut secara luas sebagai pelarut inert dalam reaksi organik karena heksana bersifat sangat tidak polar. N-heksana dibuat dari hasil penyulingan minyak mentah dimana untuk produk industrinya ialah fraksi yang mendidih pada suhu 65-70°C. Heksana digunakan di laboratorium untuk mengekstrak minyak dan lemak (Aziz dkk., 2009).

Berikut ini adalah monografi n-heksana :

Nama resmi	: n-heksana
Sinonim	: n-heksana
RM/BM	: C_6H_{14} / 86,18
Pemerian	: Cairan jernih, mudah menguap berbau seperti eter lemah atau bau seperti potroleum.
Kelarutan	: Praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol mutlak, dapat campur dengan eter, dengan kloroform, benzena, dan sebagian besar minyak lemak dan minyak atsiri.
Penyimpanan	: Di tempat sejuk dan di dalam wadah tertutup rapat, jauhkan dari nyala api.
Kegunaan	: Sebagai pelarut ekstrak (BPOM, 1995).

2.8. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

2.8.1. Definisi Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah suatu teknik atau cara untuk pemisahan dengan menggunakan adsorben (fase stasioner) berupa lapisan tipis seragam yang disalutkan pada permukaan bidang datar berupa lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Teknik kromatografi ini banyak digunakan untuk analisis kualitatif senyawa organik, isolasi senyawa tunggal dari campuran multikomponen, analisis kuantitatif, dan isolasi berskala preparatif. (Mukhriani, 2014; Hajnos dkk., 2008).

Bahan yang digunakan untuk menyerap cairan atau gas (*sorbent*) yang diterapkan dalam KLT mempunyai karakteristik permukaan yang berbeda dan sifat fisikokimia yang berbeda juga. Pengembangan kromatografi terjadi ketika fase gerak tertapis melewati adsorben (Deinstrop dkk., 2007). KLT dapat digunakan jika :

1. Senyawa tingkat penguapannya rendah atau tidak menguap
2. Senyawa bersifat polar, semi polar, non polar, atau ionik.
3. Sampel dalam jumlah banyak harus dianalisis secara simultan, hemat biaya, dan dalam jangka waktu tertentu.
4. Sampel yang akan dianalisis akan merusak kolom pada Kromatografi Cair (KC) ataupun Kromatografi Gas (KG).
5. Pelarut yang digunakan akan mengganggu penjerap dalam kolom Kromatografi Cair.
6. Senyawa dalam sampel yang akan dianalisis tidak dapat dideteksi dengan metode KC ataupun KG atau memiliki tingkat kesulitan yang tinggi.
7. Setelah proses kromatografi, semua komponen dalam sampel perlu dideteksi (berkaitan dengan nilai R_f).

2.8.2. Fase Diam

Fase diam adalah salah satu komponen penting dalam teknik pemisahan KLT (kromatografi lapis tipis) . Fase diam berupa lapisan tipis seragam yang disalutkan pada permukaan bidang datar berupa lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Fase diam digunakan pada kromatografi lapis tipis yaitu plat yang terdiri dari partikel yang homogen atau berpori (Mukhriani, 2014). Pelarut

dapat berjalan ke atas plat (fase diam) dengan noda sampel pada pengikat tepat diatas pelarut. komponen paling polar dari sistem pelarut menjadi akan memberikan noda pada dekat garis start. Sedangkan yang komponen kurang polar akan menimbulkan noda menjauhi garis start (Deinstrop dkk., 2007).

Silika gel atau Silika adalah fase diam yang sering digunakan dalam teknik pemisahan kromatografi. Penggunaan silika sebagai fase diam karena mempunyai karakteristik adsorpsi yang kuat. Selain sebagai adsorben, silika gel digunakan sebagai pengering karena dapat menyerap berbagai macam zat. Silika adalah bentuk koloid yang dipolimerisasi asam silikat. Asam silikat, H_2SiO_4 , tidak tersedia sebagai monomer bebas namun tersedia dalam bentuk larutan natrium silikat. Bila larutan natrium silikat diasamkan maka akan terbentuk polimer silika polimer. Silika gel yang digunakan untuk kromatografi mengalami proses pemurnian untuk menghilangkan kotoran logam dan kemudian dilumatkan, dikeringkan dan difraksinasi dalam ukuran partikel yang sesuai (Gandjar dan Rohman, 2012).

Silika memiliki luas permukaan antara 200-800 g. Besarnya luas permukaan silika gel menjadikan silika memiliki stuktur yang berpori. Diameter pori yang baik pada teknik pemisahan kromatografi yaitu 60-150 Å (satu angstrom adalah 10^{-10} m). Pada teknik pemisahan senyawa dengan KLT menggunakan plat silika gel GR, GF254 R, HF254 R dll. Plat silika gel tersebut memiliki ketebalan lapisan 0,25 mm atau 0,5 mm. Ukuran maksimum pelat KLT yang digunakan adalah 20 × 20 cm (Gandjar dan Rohman, 2012; Deinstrop dkk., 2007).

2.8.3. Fase Gerak

Fase gerak merupakan zat yang membawa komponen suatu campuran melalui fase diam. Pada KLT, fase gerak lebih nonpolar daripada fase diam dan dari pelarut organik. Fase gerak tersebut memiliki tujuan, yaitu untuk:

1. Menjaga analit dalam larutan.
2. Mengangkut analit melalui fase diam.
3. Berkontribusi pada pemisahan.
4. Bersaing dengan analit untuk proses adsorpsi pada fase diam.

Jika digunakan fase diam silika yang merupakan adsorben polar maka digunakan fase gerak non polar. Kekuatan fase gerak ditentukan oleh polaritas

pelarut yang digunakan dan kepolaran pelarut yang digunakan (Hansen dkk., 2012).

2.9. Metode Pengujian Antibakteri

Tujuan uji kepekaan antimikroba adalah untuk memberikan data in vitro mengenai ketepatan dan kemampuan antimikroba dalam pengobatan sehingga mendapatkan jaminan pengobatan yang optimal. Uji kepekaan terhadap obat antibakteri pada dasarnya dapat dilakukan melalui tiga cara, yaitu :

1. Metode dilusi

Metode dilusi adalah salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui potensi suatu senyawa terhadap aktifitas mikroba dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Penentuan KHM dan KBM dilakukan dengan metode dilusi cair Kirby and Bauer yang dimodifikasi menggunakan media cair *Nutrien Broth* (NB) dan diukur absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis sebelum dan sesudah inkubasi untuk melihat pertumbuhan jamur yang diuji (Fatisa, 2013).

Prinsipnya adalah menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Setelah itu masing-masing diuji dengan obat yang telah diencerkan secara serial, yaitu tabung reaksi tersebut kemudian diukur absorbansi (Optical Density = OD) jamur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya tabung-tabung tersebut diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Setelah diinkubasi, diukur lagi absorbansi jamur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis KHM ditentukan dengan membandingkan absorbansi perlakuan inkubasi dikurangi absorbansi sebelum perlakuan. Nilai KHM (konsentrasi hambat minimum) sangat bervariasi dan bergantung pada kondisi inkubasi, media pertumbuhan jamur, jenis kultur yang digunakan, dan bagaimana cara pertumbuhan jamur yang diteliti (Fatisa, 2013; Azrifitria dkk., 2010).

2. Metode difusi cakram

Metode difusi cakram merupakan teknik mikrobiologi klasik yang paling sering digunakan untuk uji kepekaan antimikroba. Hal ini karena metode tersebut aman, murah, dan efisien. Metode ini dilakukan dengan meletakkan cakram

kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan mikroba uji. Zona bening akan terbentuk disekitar cakram sebagai inokulasi dari pertumbuhan mikroba. Zona bening yang terbentuk pada media yang telah diinokulasi mikroba disekitar cakram kertas yang di celupkan sampel menunjukkan aktivitas penghambatan dari sampel terhadap mikroba uji. (Ngaisah, 2010; Choma, 2011).

Pencelupan cakram kertas ke dalam larutan sampel sampai merata di seluruh permukaan cakram kertas. Cakram dicelupkan ke dalam larutan sampel sampai merata di seluruh permukaan cakram dengan berbagai macam konsentrasi yang telah disiapkan. Konsentrasi terendah dari sampel yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba uji merupakan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Penuangan media Nutrient Agar (NA) yang telah disterilkan ke dalam petridish. Agar-agar biasanya mengandung (berat/volume): 30,0% infus daging sapi; 1,75% kasein hidrolisat; 0,15% tepung; agar agar 1,7%; pH disesuaikan ke netral pada suhu 25°C (Ngaisah, 2010; Choma, 2011).

3. Bioautografi (Hajnos, 2008)

Bioautografi merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi aktivitas antibakteri, antiviral, dan antijamur. Metode ini pertama kali dilakukan Goodall dan levi untuk mengetahui omposisi dan kemurnian antibiotik penisilin dalam suatu campuran. Pada metode ini terdapat hal-hal yang perlu diperhatikan seperti berikut:

1. Komposisi media
2. Mikroorganisme yang diuji
3. pH
4. Waktu inkubasi
5. Pewarnaan (Choma, 2011).

Teknik bioautografi dibagi menjadi 3 yaitu bioautografi langsung, bioautigrafi kontak, dan bioautografi celup. Pada bioautografi kontak senyawa uji atau antibiotik dipindahkan dari lapisan adsorben ke agar plate yang diinokulasikan secara langsung dengan mikroba dengan adanya kontak langsung. Setelah 15 – 30 menit, zat uji tersebut akan berdifusi ke dalam media agar dan menghambat pertumbuhan mikroba (Choma, 2011).

Pada bioautografi celup, plat kromatografi yang dikembangkan dan ditutupi dengan media agar. Setelah terjadi pepadatan, plat kromatografi ditanamkan mikroba sehingga pertumbuhan dan penghambatan pertumbuhan mikroba dapat divisualkan. Pada bioautografi langsung, semua proses pemisahan, inkubasi benih, prasyarat, dan visualisasi dilakukan pada lapisan adsorben. Pada prinsipnya adalah suspensi atau larutan mikroorganisme yang tumbuh diaplikasikan pada plat kromatografi yang telah dikeringkan. Plat kromatografi tersebut diinkubasi pada suhu optimum dimana mikroorganisme akan tumbuh dan berkembang. Proses selanjutnya adalah proses visualisasi dengan bantuan pewarna sehingga sel hidup mikroorganisme akan menyerap pewarna yang diberikan dan akan menimbulkan warna. Hal tersebut karena dehidrogenase dari mikroorganisme hidup akan mengubah garam tetrazolium menjadi korosi secara intensif yaitu formazan yang dapat menyerap zat (Choma, 2011).

